

• 综述 •

水蛭素的药理作用及临床应用研究进展[△]徐明杰^{1,2,3}, 赵迪^{1,2,3}, 李龙宇^{1,2,3}, 伍一炜^{1,2,3}, 徐嗽海^{1,2,3*}, 刘铜华^{2,3}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029;
2. 北京中医药大学 中医养生学北京市重点实验室, 北京 100029;
3. 北京中医药大学 中医养生学教育部重点实验室, 北京 100029

[摘要] 水蛭素(hirudin)为特异性凝血酶抑制剂,根据其来源可分为天然水蛭素和重组水蛭素两类。水蛭素具有抗凝、抗血栓、抗纤维化、抗细胞凋亡、舒血管和提高随意皮瓣成活率等多种药理作用,对于血管瘤、肝癌、动脉粥样硬化症、肾病综合征、高尿酸血症、输卵管炎性阻塞和白内障等疾病均具有显著的治疗作用。对近年来水蛭素的相关研究进行综述,为其进一步研发提供参考。

[关键词] 水蛭素; 重组水蛭素; 药理作用; 临床应用; 不良反应

[中图分类号] R285 [文献标识码] A [文章编号] 1673-4890(2021)04-0747-08

doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20200108007

Research Progress on Pharmacological Action and Clinical Application of Hirudin

XU Ming-jie^{1,2,3}, ZHAO Di^{1,2,3}, LI Long-yu^{1,2,3}, WU Yi-wei^{1,2,3}, XU Tun-hai^{1,2,3*}, LIU Tong-hua^{2,3}

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
2. Beijing Key Laboratory of Health-cultivation, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;
3. Health-cultivation Laboratory, Ministry of Education, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

[Abstract] Hirudin is the strongest specific thrombin inhibitor discovered to date. A large number of basic experimental and clinical studies have confirmed that hirudin has a variety of pharmacological effects, such as anticoagulation, antithrombotic, anti-fibrosis, anti-apoptosis, vascularization and improvement of survival rate of free skin flap. At the same time, it has a significant therapeutic effect on hemangioma, liver cancer, atherosclerosis, nephrotic syndrome, hyperuricemia, salpingitis obstruction and cataract and so on. In this paper, the research on hirudin in recent years is analyzed and summarized to provide reference for its further development.

[Keywords] hirudin; recombinant hirudin; pharmacological action; clinical application; adverse reactions

水蛭为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman、水蛭 *Hirudo nipponica* Whitman 或柳叶蚂蟥 *W. acranulate* Whitman 的干燥全体,味咸、苦,性平,有小毒,归肝经。其具有破血通经、逐瘀消癥之功,用于血瘀经闭、癥瘕痞块、中风偏瘫、跌打损伤等证^[1]。水蛭的主要有效成分为多肽、蛋白质等大分子化合物,如水蛭素等;还含有糖脂类、甾体类、生物碱类、蝶啶类^[2]、羧酸酯类和氨基酸^[3]等多种小分子化合物。国内外研究发现,水蛭具有抗凝血^[4]、抗血栓^[5]、抗肿瘤、抗动脉粥样硬化、抗纤维化等多

种生物活性。

天然水蛭素是新鲜水蛭及其唾液腺中已提取出的多种活性成分中活性最显著并且研究最多的一种成分^[6]。生水蛭中天然水蛭素含量最高,但水蛭作为一种传统中药,多经滑石粉烫、砂烫、水煎等炮制后再用,使得天然水蛭素含量显著降低^[7-8]。另外,天然水蛭资源逐渐枯竭,供需缺口逐年扩大^[9]。20世纪80年代,国内外研究人员逐步开始利用基因工程等技术获得重组水蛭素。近年来也有学者研究水蛭分解后的小分子物质,发现胆固醇、脂肪酸酯

[△] [基金项目] 国家国际科技合作项目(2010DFB33260)

* [通信作者] 徐嗽海,教授,研究方向:中药活性成分及质量控制; E-mail: thxu@yahoo.com

等小分子物质也具有抗凝血作用,但抗凝作用均弱于水蛭素^[10-11]。水蛭素仍是迄今为止发现的最强抗凝剂^[12],具有重大的研究价值和开发前景。现对国内外近年来水蛭素相关文献进行分析和总结,从天然水蛭素和重组水蛭素2个方面进行综述,为水蛭素的进一步研究提供参考。

1 天然水蛭素

1.1 结构、功能与特点

天然水蛭素是一种相对分子量在7000左右的酸性单链多肽,由64~66个氨基酸组成,含有3个二硫键而无多糖存在,目前已分离鉴定出7种异构体^[13],具有活性高、结构稳定、不易失活等特点^[14]。天然水蛭素含有6个三维结构和分布位置都很相似的半胱氨酸残基,凝血酶活性结合位点位于其结构紧密(由二硫键形成)的N端(肽1~48);凝血酶纤维蛋白原结合位点则位于其富含酸性氨基酸残基的C端(肽55~65);中间区(肽49~54)的氨基酸残基则发挥调节作用^[15]。天然水蛭素由于其肽链的特殊结构,具有极强的抗凝血作用。其渗透能力和稳定性均较强,不会被胰蛋白酶和糜蛋白酶破坏,在pH和温度变化稍大情况下亦不会分解,可以口服,并且被分解后的片段也具有抗凝血效果^[16],但在某些特殊条件,如强碱性和高温同时存在时,会导致其不可逆的失活^[17]。

1.2 药理作用

1.2.1 抗凝血、抗血栓作用 在动物实验中发现,对于股动脉吻合术后的Wistar大鼠及右旋糖酐所致兔血瘀模型,天然水蛭素可加速血瘀部位的血流速度、改善血液流变学异常、抑制血小板聚集、提高血管通畅率,抗血栓效果显著^[18-19]。

1.2.2 抗纤维化作用 有研究发现,天然水蛭素可抑制牙龈成纤维细胞、肌腱成纤维细胞生长,并且对于肾间质纤维化、肾小管上皮细胞纤维化、肺间质纤维化、特发性肺间质纤维化(IPF)具有抑制作用^[20-26]。天然水蛭素抗纤维化的可能机制包括3个方面:1)调节碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)分泌,抑制成纤维细胞的生长、增殖并进一步抑制瘢痕形成,抑制纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)生成及活性,减少纤维蛋白沉

积,促进胶原的溶解^[20-22];2)降低了单侧输卵管阻塞大鼠肾间质单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)的表达^[23-24];3)降低蛋白激酶B(Akt)、磷酸化Akt(p-Akt)蛋白的表达量,减缓IPF病程发展^[25]。相关信号通路有3个:TGF- β_1 /Smads信号通路^[21]、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/Akt信号通路^[25]和Janus激酶(JAK)/信号传导转录激活因子3(STAT3)信号通路^[26]。

1.2.3 调节微血管再生作用 天然水蛭素能够促进随意皮瓣血管内皮细胞生长因子表达并提高其成活率,以促进新微血管生成^[27]。血管内皮生长因子(VEGF)/Notch信号通路作为经典的促血管生成分子通路,可以促使人多功能干细胞分化成人微血管内皮细胞(HMVECs)。有研究发现,天然水蛭素可调节血管再生,在低浓度4 ATU·mL⁻¹时(ATU为37℃下灭活1个NIH单位凝血酶的量),可能通过VEGF-Notch信号通路促进HMVECs增殖并促进血管生成;在高浓度7 ATU·mL⁻¹时则主要发挥拮抗凝血酶和抗炎作用,通过改善微循环而抑制血管再生^[28]。Peng等^[29]研究发现,天然水蛭素还可通过蛋白酶活化受体(PARs)/p38/核转录因子- κ B(NF- κ B)途径提高大鼠皮瓣存活率。

1.2.4 抗肿瘤作用 有研究发现,天然水蛭素在体外可有效促进小鼠血管瘤EOMA细胞的凋亡并抑制其增殖,且呈现明显的剂量效应关系^[30]。李先建等^[31]研究发现,天然水蛭素可能通过下调VEGF表达抑制肝癌HepG2细胞增殖、迁移及侵袭。刘冬华等^[32]研究发现,天然水蛭素可能通过诱导癌细胞凋亡并阻滞细胞周期于G₂/M而抑制鼻咽癌CNE2细胞增殖,该作用可能与天然水蛭素上调Bax、p21 mRNA表达有关。

1.2.5 改善输卵管炎性阻塞作用 廖春芳等^[33]对输卵管炎性阻塞大鼠进行天然水蛭素盆腔注射,以甲硝唑为阳性对照组,苏木精-伊红(HE)染色后观察实验前后大鼠输卵管形态和结构,并检测大鼠输卵管VEGF蛋白的表达。结果表明,盆腔注射天然水蛭素后,大鼠输卵管结构有明显改变和改善,说明天然水蛭素对输卵管炎性阻塞有明显的治疗作用,该研究结果为输卵管炎性阻塞、女性不孕不育的治疗提供了新的思路。

1.2.6 抗痛风作用 刘喜华等^[34]从金边蚂蝗中提取天然水蛭素,采用小鼠高尿酸血症模型、小鼠慢性高尿酸模型和大鼠急性痛风性炎症模型,以别嘌醇片为阳性对照,观察天然水蛭素对高尿酸血症的影响以及抗痛风的效果。结果表明,天然水蛭素具有显著的抗高尿酸血症和抗痛风作用,能够降低血清尿素氮水平,显著抑制人葡萄糖易化转运蛋白9 (GLUT9)的表达,减轻肾脏病理学损伤,提示天然水蛭素抗痛风作用机制可能与保护肾脏及调节GLUT9表达有关。

1.2.7 改善肾功能作用 天然水蛭素可减轻糖尿病肾病模型鼠的肾损伤,改善肾功能,其发挥作用的可能机制有3个方面:1)抑制瞬时受体电位阳离子通道6 (TRPC6)的表达从而减少钙离子内流,保护肾足细胞,进而改善肾功能^[35];2)减少RhoA蛋白,保护足细胞骨架,维持足细胞骨架形态和密度;3)抑制VEGF和TGF- β_1 的表达从而发挥改善肾功能的作用^[36]。天然水蛭素改善肾功能的其他途径及与其他药物的协同增效作用有待进一步研究。

1.2.8 其他作用 李畅^[37]通过血管环实验及大电导钙激活钾通道(BKCa)动力学模型研究发现,天然水蛭素具有舒血管作用,可能是通过激活BKCa通道实现的。李红等^[38]研究发现,天然水蛭素可减轻脑出血大鼠的脑水肿、降低脑细胞凋亡率、缓解神经功能受损情况,其抗脑细胞凋亡的机制可能与抑制JAK2/STAT3信号通路有关。

1.3 临床应用

1.3.1 抗血栓作用 在临床上,天然水蛭素对于高血压、深静脉血栓形成后综合征及骨折后伴发下肢静脉血栓症的患者具有很好的抗栓作用。王继娟等^[39]研究发现,天然水蛭素可抑制凝血酶活性、保护血管内皮,从而有效改善高血压患者的凝血功能和内皮功能,预防血栓。杨燕菲等^[40]研究发现,水蛭素能够通过抑制骨折后伴发下肢静脉血栓症患者的凝血酶活性及凝血功能,降低血浆D-二聚体(D-D)、纤维蛋白原(FIB)水平,改善高凝状态,防止血栓形成。杨光唯等^[41]在深静脉血栓形成综合征(PTS)临床研究中,以地奥司明片为对照组,脉血康胶囊(天然水蛭素)为实验组,测量患肢小腿的周径差(CPD)并进行血液流变学和凝血功能检测,发

现天然水蛭素可延长凝血时间并减少血栓形成,有效缓解PTS患者水肿程度。

1.3.2 改善肾病综合征作用 天然水蛭素可降低肾病综合征患者凝血酶激活的纤溶抑制物(TAFI)水平、提高抗凝血酶-III(AT-III)活性、延长凝血时间、改善肾病综合征患者的高凝状态和纤溶系统功能,进而促进肾病综合征的缓解并改善其预后^[42]。

1.3.3 改善脑梗死作用 天然水蛭素可改善急性脑梗死患者的血管内皮功能和神经功能^[43],并能改善恢复期患者血液高凝状态,不会增加出血风险^[44]。

1.4 不良反应

有研究发现,长期服用脉血康胶囊(天然水蛭素)会出现消化道出血、皮肤黏膜自发性瘀斑、牙龈出血、腹胀、恶心、过敏等不良反应^[45]。老人和孕妇及有出血倾向者禁用。

2 重组水蛭素

2.1 来源、结构与功能

研究人员为了缓解水蛭资源短缺问题,利用化学合成、逆转录等方法获得天然水蛭素的基因序列,并将该基因序列转接到在大肠杆菌、毕赤酵母、枯草杆菌等菌类中发酵,进一步分离纯化得到重组水蛭素。目前,重组水蛭素有多种变体,主要为HV1、HV2、HV3 3种类型^[46-48]。在结构上,重组水蛭素与天然水蛭素仅63位的酪氨酸有所不同,天然水蛭素63位酪氨酸磺酸化成为Tyr-SO₃,而重组水蛭素则未发生磺酸化,但重组水蛭素在主要的二级结构上与天然水蛭素几乎完全相同^[49];在功能上,重组水蛭素因结构上的天生缺陷,使其抗凝活性低于天然水蛭素^[50]。

2.2 药理作用

2.2.1 抗凝、抗血栓作用 研究发现,重组水蛭素具有明显的抗血栓作用,且注射和口服均能发挥药效^[51]。在动物实验中,对于大鼠静脉血栓和动脉血栓、兔弥散性血管内凝血,重组水蛭素可明显延长活化部分凝血活酶时间,并抑制纤维蛋白原水平和抗凝血酶活性,以达到抗凝、抗血栓效果。其抗静脉血栓强度约为肝素的4倍,且重组水蛭素给药剂量与血栓干质量呈负相关^[52-54]。其作用机制可能与影响外源性凝血系统、促进纤溶功能有关:1)重组

水蛭素可以延长血浆凝血酶原时间(PT),增加组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)的释放,同时抑制PAI-1的释放,且具有内皮保护作用^[55];2)重组水蛭素可通过抑制凝血酶,特别是干扰或阻碍凝血酶-血栓调节蛋白复合物(Th-TM)的形成,从而有效地抑制Th或Th-TM对TAFI的活化,减少TAFIa的产生,进而达到抗血栓的目的^[56]。

2.2.2 抗动脉粥样硬化作用 重组水蛭素可改善载脂蛋白E基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠动脉粥样硬化、调节小鼠血清血脂水平、抑制血管内皮增生、减少胶原纤维增生,从而改善ApoE^{-/-}小鼠的血脂、内皮功能;还能够降低血清炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、C-反应蛋白(CRP)水平,并减少动脉粥样硬化斑块中B型清道夫受体CD36、Toll样受体4(TLR4)/NF- κ B的表达,进而改善主动脉粥样硬化慢性炎症反应^[57]。重组水蛭素还可能通过下调基质交感分子1、Orai1蛋白、瞬时受体电位通道1的表达,延缓动脉粥样硬化的发生与发展^[58]。

2.2.3 抗肿瘤作用 吴晓强等^[59]研究发现,重组水蛭素可以显著抑制人肝癌SMMC-7721细胞的增殖,并促进其凋亡,而且能够有效逆转凝血酶导致的生长促进及凋亡抵抗作用,其分子机制可能是重组水蛭素显著降低了肿瘤细胞中抗凋亡基因Bcl-2 mRNA及蛋白表达量并升高促凋亡基因Bax mRNA及蛋白表达量。杨笑染等^[60]研究发现,重组水蛭素能降低喉癌细胞中蛋白酶活化受体(PAR-1)的表达,从而抑制VEGF、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的表达,进而抑制喉癌细胞的转移,最终发挥抗肿瘤的作用。

2.2.4 减轻脑损伤作用 时宏娟等^[61]研究发现,重组水蛭素可通过特异性抑制凝血酶及干预脑水肿周边组织炎症反应,显著减轻脑出血模型大鼠的脑水肿,并可长期改善大鼠神经功能缺陷,明显降低脑出血后致残率。周中和等^[62]研究发现,重组水蛭素可能通过减少TNF- α 和ICAM-1的表达对大鼠脑出血血肿周边炎症组织进行干预,从而减轻脑损伤。

2.2.5 提高随意皮瓣成活率作用 在兔耳静脉淤血模型中,局部使用重组水蛭素可以诱导bFGF的表达,促进微血管增生,从而改善皮瓣淤血状态,提高静脉淤血皮瓣的成活率^[63-64]。郭应信等^[65]研究发

现,重组水蛭素可减少随意皮瓣淤血模型大鼠淤血皮瓣局部丙二醛(MDA)水平,减轻皮瓣局部炎症反应,减少淤血皮瓣局部内皮素水平,以提高随意皮瓣成活率。另有研究发现,对于大鼠皮肤撕脱伤,局部应用重组水蛭素可有效降低血液中黏附因子CD11b/CD18及组织中ICAM-1的作用,减轻组织炎症反应,改善缺血再灌注过程中对血管内皮细胞的损伤,从而显著提高皮肤撕脱伤后皮瓣的愈合率^[66]。

2.2.6 缓解肾间质纤维化作用 周学锋^[67]用单侧输卵管结扎法制备小鼠肾纤维化模型,给予重组水蛭素治疗后,发现小鼠肾功能有所改善,肾皮质变薄,肾脏病变程度减轻,肾间质胶原纤维阳性染色面积明显缩小,肾组织 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和岩藻糖基转移酶-8(FUT-8)的表达水平明显降低,说明重组水蛭素可缓解肾间质纤维化。

2.2.7 抗白内障作用 孙宇等^[68]分别采用D-半乳糖和亚硒酸钠诱发哺乳期大鼠白内障模型,采用重组水蛭素干预治疗,并利用家兔进行眼刺激实验以检测重组水蛭素的安全性。结果表明,重组水蛭素能够降低大鼠晶状体的浑浊度和MDA水平,升高超氧化物歧化酶(SOD)水平,对于糖性白内障和硒性白内障均有较好的防治作用,且安全无刺激。另有研究发现,在高浓度半乳糖诱导的人晶状体上皮细胞白内障模型中,重组水蛭素可降低热休克蛋白70(Hsp70)、Hsp27和 α B晶体蛋白的表达,显著缓解高浓度半乳糖导致的Hsp耐受,即降低高浓度半乳糖对晶状体上皮细胞的伤害,从而对晶状体上皮细胞起保护作用^[69]。

2.2.8 其他作用 罗家明等^[70]研究发现,重组水蛭素可缓解小鼠实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE),且该作用机制可能与其抑制小鼠脑组织中MMP-9和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA表达,从而降低MMP-9和NO水平有关。漆勇^[71]用香烟烟熏联合气管内注入脂多糖(LPS)法建立慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠模型,采用重组水蛭素干预治疗后,可减轻COPD大鼠气道重塑,该作用机制可能与降低支气管肺组织中TNF- α 水平、减少磷酸化的细胞外蛋白调节激酶(p-EPK)表达有关。重组水蛭素对于脑梗死患者的阿司匹林抵抗具有很好的改善效果^[72]。

2.3 临床应用

2.3.1 改善肝素诱导性血小板减少症作用 肝素诱导性血小板减少症严重者常伴有血栓并发症,需要抗凝药物参与治疗。Lubenow 等^[73]研究发现,在肝素诱导的血小板减少症中,重组水蛭素可发挥抗凝作用,有效阻止血栓发生,但在其应用过程中需进行监测和剂量调整。

2.3.2 改善心肌梗死作用 有研究发现,对于急性心肌梗死患者,重组水蛭素可加速链激酶诱导的梗死区血管通畅,且不会增加主要出血并发症^[74]。对于不稳定型心绞痛患者,在常规治疗的基础上加以天然水蛭素干预可显著提高治疗效果,不良反应小,还可减少心肌梗死的发生^[75]。

2.4 不良反应

重组水蛭素主要通过肾脏排出,约占全身清除率的90%,肾功能不足患者不宜使用重组水蛭素。其主要不良反应是出血和抗水蛭素抗体的缺少,湿疹、皮疹、热病、发热、寒战、荨麻疹、支气管痉挛、血管水肿和注射部位反应都与使用重组水蛭素有关,首次接触的过敏风险估计为0.015%,再次接触的过敏风险估计为0.16%。在某些临床使用情况下,尤其是在体外循环手术中,缺乏抗水蛭素抗体的解毒剂仍然是一个令人担忧的问题^[76]。另外,重组水蛭素半衰期的延长也使其达到抗凝效果所需的治疗性剂量下降,在使用过程中需对其进行监控和剂量调整^[77]。

3 结语

天然水蛭素和重组水蛭素统称为水蛭素,在结构上,天然水蛭素和重组水蛭素仅在其63位有所不同,前者63位酪氨酸磺酸化成为 Tyr-SO₃,而重组水蛭素则未发生磺酸化。天然水蛭素与凝血酶直接结合,且不可逆,使得其抗凝效果优于肝素。在药理作用上,天然水蛭素和重组水蛭素均具有抗凝、抗血栓、抗肿瘤、抗纤维化、减轻脑损伤以及提高随意皮瓣成活率等作用。两者又有所不同,如天然水蛭素还具有抗痛风、改善输卵管炎性阻塞、舒血管、改善肾功能等作用,重组水蛭素还具有抗白内障、抗动脉粥样硬化、减轻 COPD 大鼠气道重塑以及缓解 EAE 等作用。但对

于各药理作用机制的研究尚处于初步阶段,信号通路不够明确,各通路之间是否存在交互作用也未知。对于天然水蛭素和重组水蛭素都具有的药理作用,鲜有两者作用强度的比较研究;两者不同的药理作用是否存在相同的可能,如天然水蛭素是否也具有抗白内障的作用、作用机制是否相同等均有待进一步研究探讨。

对于天然水蛭素,目前使用较多的主要为天然水蛭素冻干粉和脉血康胶囊2种。对于重组水蛭素,多由实验室自行生产或直接购买,目前使用较多的变体为 HV1、HV2、HV3 3种类型。除此之外,也有研究人员对水蛭素进行了药物开发。周维海^[78-79]研发出天然水蛭素软膏和舌下含片2款产品,前者可治疗浅表性血栓静脉炎、烧伤、皮肤皲裂、皮肤溃疡等症,还具有软化疤痕、防止疤痕增生的作用;舌下含片易吸收,可有效防治心脑血管疾病如高血压、高脂血症、卒中及其后遗症等。齐正新等^[80]研发的水蛭复方制剂为百年经验方,原名为蚂蟥通管散,可治疗输卵管阻塞,药力在扩管疏通的同时,还可强制促使输卵管和管内纤毛运动。柯宏^[81]研发的一种含水蛭素的药物组合物可综合性缓解动脉粥样硬化、血脂异常、血小板聚集等多种关键病理环节以防治心脑血管疾病。张雪等^[82]研发的鞣酸水蛭素片剂可保护水蛭素在口服后不被胃酸分解,从而提高了水蛭素的生物利用度。谢海林^[83]研发的重组水蛭素滴眼液不但可以使重组水蛭素长时间滞留于病灶区,且无刺激作用,还可以保证药品储存的稳定性。水蛭素作为一种特异性凝血酶抑制剂,可有效抑制凝血,并且具有多种药理作用,具有研究价值和开发前景。但目前对水蛭素的药物研发较少,相关药物的开发还有待加强。

提高临床疗效并且减少不良反应是水蛭素进一步研究的方向,可通过联合其他药物、复方或技术提高其临床疗效,如天然水蛭素联合高压氧治疗可显著提高随意皮瓣成活率^[84];发掘更加安全有效稳定的重组水蛭素培养载体;加快相关机制研究,在其发挥作用的过程中抑制不良反应的发生;致力于抗水蛭素抗体的研制。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M].

- 北京:中国医药科技出版社,2020:85-86.
- [2] 郑云枫,程建明,彭国平. RP-HPLC 测定水蛭中3种蝶啶类活性成分的含量[J]. 南京中医药大学学报, 2011, 27(6): 573-574.
- [3] 荆文光,符江,刘玉梅,等. 水蛭的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 120-123.
- [4] TRABOLD K, MAKHOUL S, GAMBARYAN S, et al. The direct thrombin inhibitors dabigatran and lepirudin inhibit GPIIb/IIIa-mediated platelet aggregation[J]. Thromb Haemost, 2019, 119(6): 916-929.
- [5] YAO X L, LIU H, LI P, et al. Aqueous extract of *Whitmania pigra* Whitman alleviates thrombus burden via sirtuin 1/NF- κ B pathway[J]. J Surg Res, 2020, 245: 441-452.
- [6] 石玥. 槲皮素、水蛭素、桂皮醛及其复方对高糖致大鼠 DRGn 细胞凋亡的影响[D]. 北京:北京协和医学院, 2013.
- [7] 戴作波. 水蛭及其炮制品中水蛭素的测定[J]. 求医问药(下半月), 2012, 10(12): 343-344.
- [8] 许石钟. 水蛭经炮制后的化学成分变化研究[J]. 陕西中医, 2018, 39(7): 980-982.
- [9] 丁立威. 水蛭产供销趋势分析[J]. 中国现代中药, 2013, 15(9): 808-811.
- [10] 刘曙晨. 水蛭抗凝血作用及化学成份的研究[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2006.
- [11] 李艳玲,黄荣清. 水蛭抗凝血作用实验研究及化学成分分析[J]. 中兽医医药杂志, 2010, 29(1): 7-10.
- [12] 段超,刘娟. 仿生诱导高效提取水蛭素及分离纯化的研究[J]. 黑龙江医药科学, 2008, 31(3): 40-41.
- [13] 顾银良,罗春贞. 水蛭素衍生物基因的克隆及其在哺乳类细胞中的表达[J]. 上海医科大学学报, 1996, 3(3): 185-188.
- [14] 林晓洋. 天然水蛭素分离纯化研究[D]. 南宁:广西大学, 2007.
- [15] 王鸿利,王立志. 水蛭素的基础与临床[J]. 上海医学, 1999, 22(11): 695-697.
- [16] 焦燕. 水蛭素多肽改性丙烯酸系人工晶状体及其性能的研究[D]. 广州:华南理工大学, 2013.
- [17] 孙雪. 蚂蟥酶解物肠吸收机制及其抗凝物质基础初探[D]. 北京:北京中医药大学, 2015.
- [18] 胡哲,张静,郭鹏年. 局部应用水蛭素对大鼠血管吻合模型术后血栓形成的观测[J]. 卫生职业教育, 2014, 32(24): 84-86.
- [19] 崔美月,牟秀云,陈云,等. 水蛭素对右旋糖酐所致大白兔血瘀模型血液流变学的影响[J]. 社区医学杂志, 2014, 12(15): 28-30.
- [20] 郑怡,禡坤,南澜,等. 水蛭素对牙龈成纤维细胞碱性成纤维细胞生长因子和转化生长因子 β_1 表达的影响[J]. 华西口腔医学杂志, 2015, 33(1): 6-10.
- [21] 曾林如,汤样华,王楠. 天然水蛭素对肌腱成纤维细胞抑制作用的体外研究[J]. 中国医学创新, 2018, 15(5): 9-12.
- [22] 李红,谢海彬,刘敏,等. 水蛭素对博莱霉素致特发性肺间质纤维化大鼠肺组织病理变化的影响[J]. 中医临床研究, 2019, 11(7): 1-6.
- [23] 任桐,朱鹏宇,杨洪涛. 水蛭素对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质损伤及 MCP-1、ICAM-1 的干预效应研究[J]. 天津中医药, 2019, 36(5): 477-481.
- [24] 任桐,朱鹏宇,杨洪涛. 水蛭素对单侧输尿管结扎大鼠肾间质纤维化的干预研究[J]. 四川中医, 2019, 37(2): 64-68.
- [25] 张景容,谢海彬,沈明霞,等. 水蛭素对博莱霉素致特发性肺间质纤维化大鼠肺组织中 AKT、p-AKT 蛋白表达的影响[J]. 中医临床研究, 2019, 11(11): 5-9.
- [26] 范丽,董正华,杨海霞,等. 水蛭素通过 JAK/STAT3 信号通路缓解人肾小管上皮细胞纤维化的相关机制研究[J]. 中药材, 2018, 41(4): 982-985.
- [27] 郭应信,殷国前,李佳荃,等. 天然、重组水蛭素对随意皮瓣淤血模型血管内皮细胞生长因子的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(7): 1210-1214.
- [28] 林冠宇,林博杰,朱江英,等. 天然水蛭素对人微血管再生作用的初步研究[J]. 中国修复重建外科杂志, 2018, 32(12): 1586-1591.
- [29] PENG L, PAN X Y, YIN G Q. Natural hirudin increases rat flap viability by anti-inflammation via PARs/p38/NF- κ B pathway[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 597264.
- [30] 杨才志,陈胜贤,黄锦菁,等. 水蛭素对小鼠 EOMA 血管瘤细胞体外增殖及凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(16): 4445-4446.
- [31] 李先建,何剑波,陈闯,等. 水蛭素对肝细胞癌 HepG2 细胞抑制作用机制探讨[J]. 中国癌症防治杂志, 2016, 8(1): 7-11.
- [32] 刘冬华,黄玲莎,苏承武,等. 水蛭素对鼻咽癌 CNE2 细胞株作用机制的研究[J]. 广西医科大学学报, 2016, 33(1): 27-29.
- [33] 廖春芳,胡晓玲. 水蛭素盆腔灌注对大鼠阻塞性输卵管炎的作用研究[J]. 现代诊断与治疗, 2014, 25(16): 3816-3817.
- [34] 刘喜华,赵应学,周元明,等. 水蛭素抗痛风作用及其机制研究[J]. 中草药, 2018, 49(6): 1365-1370.
- [35] 陈茂盛. 水蛭素对糖尿病肾病足细胞损伤的保护作用及机制[C]//中国中西医结合学会. 中国中西医结合学会肾脏疾病专业委员会 2018 年学术年会论文集. 北

- 京:中国中西医结合学会 2018:442.
- [36] 陈钦,吴亚琴,赵静雅,等.水蛭素对被动型 Heymann 肾炎模型大鼠足细胞 Nephrin 表达的影响[J].中国中西医结合肾病杂志 2017,18(12):1041-1045.
- [37] 李畅.水蛭素的舒血管作用及机制研究[C]//中国生理学会.中国生理学会第24届全国会员代表大会暨生理学学术大会论文汇编.北京:中国生理学会 2014:289-290.
- [38] 李红,吴黎黎,高青,等.水蛭素对脑出血大鼠蛋白酪氨酸激酶2/信号转导和转录激活因子3信号通路的影响[J].中国脑血管病杂志 2017,14(12):638-643.
- [39] 王继娟,王维华.水蛭素对高血压患者凝血功能及内皮功能影响的研究[J].新中医 2019,51(5):123-125.
- [40] 杨燕菲,吴鹏.水蛭素治疗骨折后伴发下肢静脉血栓的临床疗效及可能机制[J].中国生化药物杂志 2016,36(6):173-175.
- [41] 杨光唯,来集富,卢惟钦,等.水蛭素治疗深静脉血栓形成后综合征的临床研究[J].中药材 2016,39(3):663-665.
- [42] 徐海燕,陈学勋,刘蒙蒙,等.水蛭素对肾病综合征患者凝血酶激活的纤溶抑制物的影响及疗效观察[J].中成药 2015,37(4):918-921.
- [43] 刘绪宏,许笑天,祝峰,等.脉血康胶囊对急性脑梗死患者血管内皮功能及神经功能评分的影响[J].武警医学 2016,27(3):297-299.
- [44] 吴修华,向周.脉血康胶囊对脑梗死恢复期患者的临床效果研究[J].中国现代药物应用 2018,12(23):3-5.
- [45] 刘岐,王茜,陈文阁.脉血康胶囊长期服用的疗效及安全性评价[J].中医药学报 2018,46(5):89-92.
- [46] 黄翠翠,吕静,吴梧桐,等.大肠杆菌分泌表达重组水蛭素Ⅲ的新方法研究[J].东南大学学报(医学版),2011,30(6):877-882.
- [47] 宋留君,周长林,窦洁,等.甘油对毕赤酵母高密度发酵表达重组水蛭素Ⅱ的影响[J].中国药科大学学报,2006,37(4):371-374.
- [48] 陈华友,齐向辉,谭小力,等.枯草杆菌重组水蛭素(HV3)的发酵工艺研究[J].安徽农业科学,2009,37(33):16246-16249.
- [49] 王朝晖,鹿峪峰,韩玉珉.重组水蛭素 HV2 的稳定性[J].生物化学杂志,1995,11(3):321-327.
- [50] 韦淑怡.天然水蛭素凝胶的研制及对大鼠皮瓣血运影响[D].南宁:广西医科大学 2014.
- [51] 阎雪莹,唐晓飞,张学农,等.重组水蛭素口服给药的抗凝效应[J].现代生物医学进展,2008,8(10):1929-1930.
- [52] 王艳春,吕莉,吴晓东,等.重组水蛭素抗大鼠静脉血栓形成的实验研究[J].第四军医大学吉林军医学院学报 2003,24(1):11-12.
- [53] 谢燕,张威,王兆钺.重组水蛭素治疗兔弥散性血管内凝血[J].中国新药与临床杂志 2005,24(6):426-429.
- [54] 任开环,韩国柱,李卫平,等.重组水蛭素抗大鼠冠状动脉血栓形成的作用研究[J].医药导报 2005,24(5):369-372.
- [55] 曹文理,李菁.重组水蛭素的抗血栓形成作用及其机制[J].中国应用生理学杂志 2018,34(4):371-374.
- [56] 黎明,张荣军,曹国宪,等.重组水蛭素促纤溶作用及其作用机制[J].药学报 2006,41(9):814-818.
- [57] 赖吴芳.重组水蛭素对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的作用及其机制的初步研究[D].南宁:广西医科大学 2018.
- [58] 田晋帆,葛长江,吕树铮,等.重组水蛭素对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块的影响及机制[J].中国中西医结合杂志 2015,35(2):198-203.
- [59] 吴晓强,李豪侠.重组水蛭素对人肝细胞癌生长的影响及分子机制研究[J].中华中医药学刊 2015,33(6):1434-1437.
- [60] 杨笑染,刘为民,庞康,等.重组水蛭素与喉癌细胞 Hep-2 中 PAR1、VEGF、MMP-2 表达的相关性研究[J].宁夏医学杂志 2016,38(12):1120-1122.
- [61] 时宏娟,沈霞,荣良群,等.局部应用重组水蛭素治疗脑出血后脑水肿的实验研究[J].徐州医学院学报,2006,26(1):61-63.
- [62] 周中和,范刚花,曲方,等.重组水蛭素对大鼠脑出血血肿周边组织炎症反应的干预作用[J].沈阳部队医药,2004,17(3):172-174.
- [63] 廖毅,王太平,童庭辉.局部应用重组水蛭素对兔耳静脉淤血皮瓣存活的影响[J].中国烧伤创疡杂志,2011,23(2):160-163.
- [64] 许尔长.重组水蛭素诱导 bFGF 表达,促进静脉淤血皮瓣存活的实验研究[D].泸州:泸州医学院 2011.
- [65] 郭应信,殷国前,李佳荃.天然与重组水蛭素对大鼠随意皮瓣淤血模型超氧化物歧化酶、丙二醛、内皮素变化的影响[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(24):4453-4456.
- [66] 江波,廖毅.重组水蛭素对大鼠皮肤撕脱伤中 CD11b/CD18 及 ICAM-1 动态表达影响的研究[J].西南医科大学学报 2017,40(2):128-131.
- [67] 周学锋.重组水蛭素对肾间质纤维化的治疗作用及其对 FUT8 的影响[C]//中国中西医结合学会.肾脏疾病专业委员会 2018 年学术年会论文集.北京:中国中西医结合学会 2018:664.
- [68] 孙宇,李运曼,夏仁睿,等.重组水蛭素对实验性白内障的防治作用[J].中国药科大学学报,2005,36(3):260-262.
- [69] 欧瑜,朱丹丹,耿培,等.重组水蛭素Ⅲ对半乳糖损伤的

- 人晶状体上皮细胞热应激蛋白表达的影响[J]. 药物生物技术 2011, 18(2): 115-118.
- [70] 罗家明, 谭强, 陈蓉, 等. 重组水蛭素对 EAE 小鼠脑组织 MMP-9 表达和 NO 含量影响的研究[J]. 中风与神经疾病杂志 2015, 32(7): 598-603.
- [71] 漆勇. 重组水蛭素对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道重塑的影响及机制研究[D]. 泸州: 西南医科大学, 2016.
- [72] 颜洋, 汪应瑞. 脉血康胶囊对治疗 78 例脑梗死患者阿司匹林抵抗临床观察[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(10): 48-50.
- [73] LUBENOW N, EICHLER P, LIETZ T, et al. Lepirudin for prophylaxis of thrombosis in patients with acute isolated heparin-induced thrombocytopenia: An analysis of 3 prospective studies [J]. Blood, 2004, 104(10): 3072-3077.
- [74] NEUHAUS K L, MOLHOEK G P, ZEYMER U, et al. Recombinant hirudin (lepirudin) for the improvement of thrombolysis with streptokinase in patients with acute myocardial infarction: Results of the HIT-4 trial [J]. J Am Coll Cardiol, 1999, 34(4): 966-973.
- [75] 何群, 黄俊军, 蔡继明, 等. 水蛭素治疗不稳定心绞痛疗效观察[J]. 实用中西医结合临床, 2008, 8(3): 3-4.
- [76] PETROS S. Lepirudin in the management of patients with heparin-induced thrombocytopenia [J]. Biologics, 2008, 2(3): 481-490.
- [77] ABEL E E, KANE-GILL S L, SEYBERT A L, et al. Direct thrombin inhibitors for management of heparin-induced thrombocytopenia in patients receiving renal replacement therapy: Comparison of clinical outcomes [J]. Am J Health Syst Pharm, 2012, 69(18): 1559-1567.
- [78] 周维海. 天然水蛭素软膏: CN1840175 [P]. 2006-10-04.
- [79] 周维海. 天然水蛭素舌下含片: CN1840176 [P]. 2006-10-04.
- [80] 齐正新, 齐红香, 齐龙文, 等. 治疗输卵管阻塞的水蛭复方制剂: CN105147930B [P]. 2019-07-12.
- [81] 柯宏. 一种用于防治心脑血管疾病的药物组合物: CN109833471A [P]. 2019-06-04.
- [82] 张雪, 赵志超, 田蓓, 等. 一种鞣酸水蛭素片剂及其制备方法: CN108815514A [P]. 2018-11-16.
- [83] 谢海林. 一种重组水蛭素滴眼液及其制备方法: CN104906037A [P]. 2015-09-16.
- [84] 蔡洁云, 林博杰, 潘新元, 等. 天然水蛭素联合高压氧治疗对大鼠随意皮瓣成活的影响研究[J]. 中国修复重建外科杂志 2018, 32(4): 484-490.

(收稿日期: 2020-01-08 编辑: 田苗)